

PRZYCZYNY WZROSTU LICZBY ZACHOROWAŃ NA KRZTUSIEC

Marta Prygiel*, Ewa Mosiej, Aleksandra Anna Zasada

Zakład Badania Surowic i Szczepionek, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny

Wpłynęło w sierpniu, zaakceptowano w grudniu 2019 r.

Streszczenie: Czynnikiem etiologicznym krztuśca jest pałeczka *Bordetella pertussis*. Pomimo globalnych programów szczepień, krztusiec pozostaje endemiczny w wielu krajach i nadal uznawany jest za istotny problem zdrowia publicznego. Szacuje się, że w 2014 roku na całym świecie na krztusiec zachorowało około 24 miliony osób, z czego 160 700 dzieci poniżej 5 roku życia zmarło. Dostępne są dwa rodzaje szczepionek przeciw krztuścowi: całokomórkowe będące zawiesinami całych inaktywowanych komórek *B. pertussis* oraz bezkomórkowe zawierające oczyszczone antygeny tej bakterii. Ze względu na to, iż szczepionki zawierające całe komórki uznawane są za bardziej reakto-genne, szczepionki acelularne są obecnie częściej stosowane. Od połowy lat 90. obserwowany jest wzrost zapadalności na krztusiec w kra-jach o wysokim poziomie zaszczepienia populacji. Wymienia się kilka czynników, które mogą być odpowiedzialne za powrót choroby w populacjach z wysokim odsetkiem osób zaszczepionych, a do najważniejszych należą spadek odporności poszczepiennej w czasie oraz presja selekcyjna stosowanych szczepień.

1. Wstęp. 2. Czynniki zjadliwości *Bordetella pertussis*. 3. Patogeneza krztuśca. 4. Obraz kliniczny krztuśca. 5. Epidemiologia. 6. Zmienność genetyczna pałeczek *Bordetella pertussis*. 7. Szczepionki całokomórkowe. 8. Szczepionki bezkomórkowe. 9. Nowe szczepionki przeciw krztuścowi. 10. Podsumowanie

CAUSES OF PERTUSSIS INCIDENCE INCREASE

Abstract: *Bordetella pertussis* is an etiological factor of whooping cough. Despite global vaccination programs, this disease remains endemic in many countries and is still recognized as a significant public health problem. It is estimated that in 2014, around 24 million people worldwide contracted pertussis, of whom 160,700 children under the age of 5 died. Two types of pertussis vaccines are available: suspensions based on whole, killed, *B. pertussis* cells and acellular pertussis vaccines containing highly purified bacterial antigens. Due to concerns of potential neurological side effects of the whole-cell vaccines, less reactogenic acellular vaccines are now more commonly used. In recent years, many developed countries have reported a resurgence of pertussis disease despite of the high vaccine coverage. Several causes have been suggested for the re-emergence of pertussis including waning immunity and bacterial adaptation resulting from the selection pressure of the used vaccinations.

1. Introduction. 2. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. 3. Pathogenesis of pertussis infection. 4. Clinical symptoms of pertussis. 5. Epidemiology. 6. Genetic variation in *Bordetella pertussis*. 7. Whole-cell pertussis vaccines. 8. Acellular pertussis vaccines. 9. Future pertussis vaccines. 10. Summary

Słowa kluczowe: krztusiec, szczepionki bezkomórkowe, szczepionki całokomórkowe

Key words: whooping cough, acellular pertussis vaccines, whole-cell pertussis vaccines

1. Wstęp

Pałeczka *Bordetella pertussis* wywołuje ostrą chorobę zakaźną dróg oddechowych zwaną krztuścem. Jest to bakteryjne zapalenie tchawicy i oskrzeli. Pomimo dostępnej od ponad 60 lat immunoprofilaktyki, krztusiec pozostaje endemiczny w wielu krajach i nadal uznawany jest za istotny problem zdrowia publicznego. Obecnie zapadalność na krztusiec jest znacznie niższa niż w erze przed rozpoczęciem szczepień, jednak od połowy lat 90. obserwowany jest stabilny wzrost zapadalności w krajach o wysokim poziomie zaszczepienia populacji. Niepokojący jest również fakt wzrostu częstości hospitalizacji oraz umieralności nieuodpornionych noworodków lub nie w pełni uod-

pornionych niemowląt. Krztusiec stał się najbardziej rozpowszechnioną chorobą w krajach rozwiniętych, której można zapobiegać poprzez szczepienia [65]. Światowa Organizacja Zdrowia oszacowała, że pomimo powszechnych programów szczepień, w 2008 r. na świecie wystąpiło około 16 milionów przypadków krztuśca (95% przypadków dotyczyło krajów rozwijających się) powodując około 195 000 zgonów wśród dzieci, z czego większość dotyczyła dzieci poniżej 5 lat [99]. Wymienia się kilka czynników, które mogą być odpowiedzialne za powrót choroby w populacjach o wysokim stopniu zaszczepienia. Są to m.in. spadek odporności poszczepiennej w czasie, presja selekcyjna szczepień, przejście ze szczepionki całokomórkowej na szczepionkę bezkomórkową, obniżenie poziomu wyszczepialności, spadek

* Autor korespondencyjny: dr n. med. Marta Prygiel, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa, tel. 22 542 12 14, e-mail: mprygiel@pzh.gov.pl

skuteczności szczepionki, zwiększenie świadomości na temat krztuśca, w tym poprawa diagnostyki i lepszy nadzór epidemiologiczny choroby [65].

Najprawdopodobniej czas trwania poszczepiennej ochronnej odpowiedzi immunologicznej, skutecznej w zapobieganiu zachorowaniom na krztusiec, jest krótszy niż zakładano. Słabnąca w miarę upływu czasu odpowiedź immunologiczna może wpływać na zwiększoną częstość zachorowań u młodzieży oraz osób dorosłych. W ten sposób dochodzi do utworzenia stałego rezerwuaru bakterii, które są źródłem zakażeń dla nieuodpornionych noworodków lub nie w pełni uodpornionych niemowląt i małych dzieci, u których choroba często przybiera najcięższą postać [38]. Szacuje się, że ochrona po immunizacji szczepionkami całokomórkowymi spada o 50% w ciągu 6 do 12 lat po szczepieniu [43], a immunizacja trzema dawkami szczepionki bezkomórkowej zapewnia ochronę przed zachorowaniem na około 5–6 lat [72]. Ponadto, jedną z podstawowych przyczyn odpowiedzialnych za skrócenie czasu skutecznej odpowiedzi poszczepiennej może być pojawienie się nowych szczepów *B. pertussis* mniej wrażliwych na działanie odpowiedzi odpornościowej [37]. Indukowanie bardziej swoistego spektrum przeciwciał przez szczepionki bezkomórkowe może wpływać na przyspieszenie powstawania zmian genetycznych w populacji bakterii *B. pertussis*. Kolejnym istotnym czynnikiem mającym potencjalny związek ze wzrostem zachorowań na krztusiec jest pojawianie się pałeczek *B. pertussis* w populacjach o wysokim poziomie zaszczepienia [38]. Presja selekcyjna, którą stanowi indukowana drogą szczepień ochronna odpowiedź immunologiczna, może prowadzić do powstania różnorodnych mutacji, których kumulacja może przejawiać się wzrostem zjadliwości lub wytworzeniem mechanizmów umożliwiających unikanie odpowiedzi poszczepiennej. Jednym z mechanizmów ochronnych może być utrata zdolności szczepu do syntezy niektórych antygenów, szczególnie tych o silnych właściwościach immunogennych. W takim przypadku, powstające w wyniku immunizacji przeciwciała nie pełnią funkcji ochronnych [14].

2. Czynniki zjadliwości *Bordetella pertussis*

Właściwości chorobotwórcze pałeczek *B. pertussis* wynikają ze zdolności syntezy szeregu czynników zjadliwości, które umożliwiają bakteriom kolonizację, namnażanie, niszczenie komórek nabłonka rzęskowego układu oddechowego oraz hamowanie odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Do najważniejszych czynników zjadliwości *B. pertussis* należą: toksyna krztuścowa Ptx (Pertussis toxin), hemaglutynina włóknikowa FHA (Filamentous Hemagglutinin Adhesin), fimbrie Fim (Fimbriae) i aglutynogeny, pertaktyna

Prn (Pertactin), cyklaza adenylova ACT (Adenylate Cyclase Toxin), cytotoksyna tchawicza TCT (Tracheal CytoToxin), toksyna dermonekrotyczna DNT (Dermonecrotic Toxin), białko BrkA (*Bordetella* resistance to killing A), lipopolisacharyd, czynnik kolonizacji tchawicy oraz składniki systemu sekrecji typu III. Ekspresja większości czynników zjadliwości (poza cytotoksyną tchawiczą) zależna jest od warunków środowiska [59]. Pod wpływem bodźców fizycznych lub chemicznych bakterie mogą zmieniać swój skład antygenowy na jeden z trzech fenotypów: niewirulentny – Bvg⁻, wirulentny – Bvg⁺ oraz pośredni – Bvgⁱ (Bvg intermediate). Proces ten zachodzi przy udziale systemu regulacji BvgAS (*Bordetella* virulence genes Activator/Sensor). W skład systemu regulacji wchodzi występujące w błonie komórkowej białko sensorowe BvgS oraz cytoplazmatyczny regulator odpowiedzi BvgA. Wrażliwe na czynniki zewnętrzne białko sensorowe zostaje ufosforylowane, następnie przenosi grupę fosforanową na białko regulatorowe BvgA, które przyłącza się do promotorów genów regulowanych i uruchamia ich transkrypcję. W zależności od stężenia wewnątrzkomórkowego fosforylowanych białek regulatorowych (BvgA-P) dochodzi do ekspresji różnych genów, które determinują występowanie różnych fenotypów *B. pertussis* [44]. Przy wysokim stężeniu BvgA-P dochodzi do aktywacji genów *vag* (virulence-activated genes) klasy 1 oraz 2 i w konsekwencji syntezy większości poznanych czynników zjadliwości. Bakterie przyjmują wówczas fenotyp Bvg⁺ i są zdolne do kolonizacji i infekcji dróg oddechowych. W warunkach laboratoryjnych czynnikiem indukującym fazę Bvg⁺ jest temperatura 37°C [44]. W fazie Bvg⁻ następuje aktywacja transkrypcji genów *vrg* (virulence-repressed genes). Bakterie syntetyzują wówczas charakterystyczne dla fenotypu Bvg⁻ białka błonowe o nieznannej funkcji [56]. Słabo poznana jest tzw. pośrednia faza fenotypu Bvgⁱ, w której bakterie wytwarzają produkty genów klasy 2 i 3 tj. odpowiednio, wspólne z fazą wirulentną adhezyny oraz specyficzne tylko dla fenotypu pośredniego, białka o niepoznanej funkcji [44].

3. Patogeneza krztuśca

Pałeczka *B. pertussis* pokonuje barierę w postaci błony śluzowej górnych dróg oddechowych gospodarza poprzez silne przyleganie do komórek nabłonka oddechowego za pomocą adhezyn, głównie toksyny krztuścовой i hemaglutyniny włóknikowej ale również za pomocą białek fimbrialnych, pertaktyny i BrkA [40]. Bakterie najczęściej są wchłaniane przez komórki nabłonkowe i nie przenikają do komórek niższych warstw, ani do krwioobiegu, do którego dostają się toksyny powodujące objawy chorobowe. Toksyna krztuścowa, cyklaza adenylova i BrkA mają znaczący wpływ na funkcje

układu odpornościowego gospodarza [75]. Cyklaza adenylowa indukuje wytwarzanie wysokich poziomów cyklicznego AMP (cAMP) zaburzając funkcje komórek układu odpornościowego. Toksyna krztuszcowa hamuje chemotaksję komórek fagocytujących w miejscu zapalenia, a BrkA chroni pałeczki *B. pertussis* przed odpowiedzią ze strony układu dopełniacza. Cytotoksyna tchawicy i toksyna dermonekrotyczna są prawdopodobnie zaangażowane w uszkodzenie komórek nabłonka tchawicy, które jest bardzo charakterystyczne dla tej choroby [75]. Utrzymywanie się objawów chorobowych przez dłuższy czas prawdopodobnie wynika ze zdolności pałeczek *B. pertussis* do interakcji z komórkami układu odpornościowego gospodarza. Bakterie hamują działanie układu dopełniacza i fagocytów oraz powodują supresję odpowiedzi komórek T i B [58].

4. Obraz kliniczny krztusca

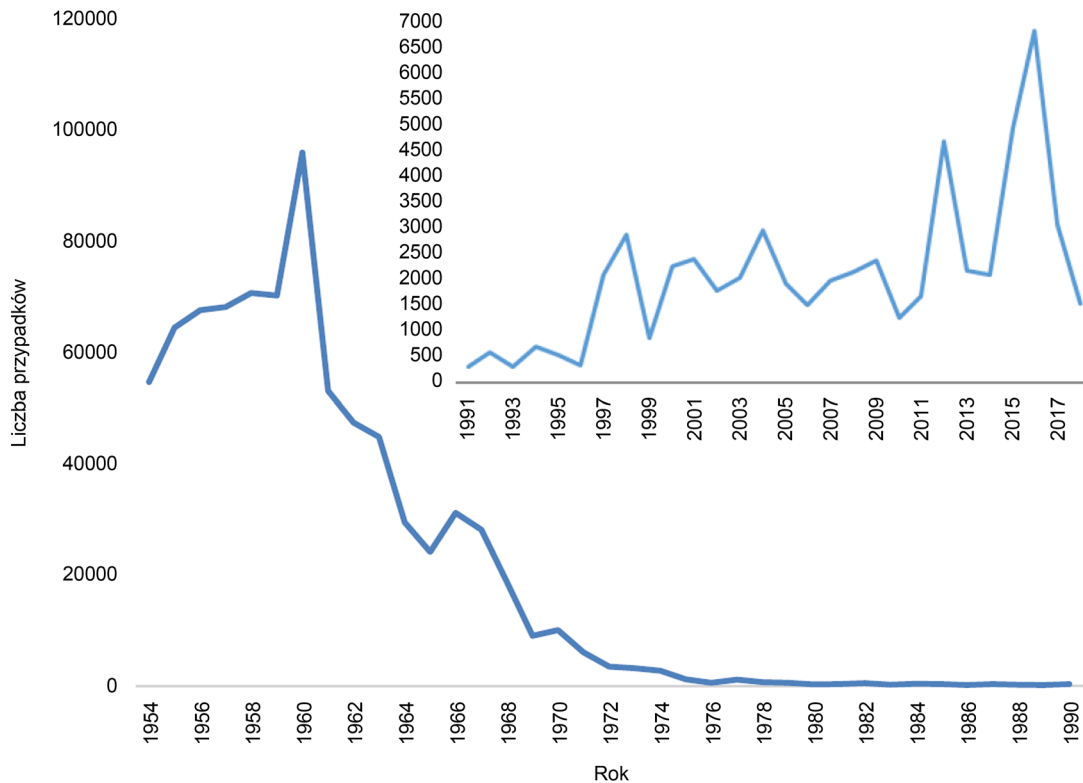
Bakteria wywołująca chorobę przenoszona jest drogą kropelkową poprzez kaszel lub kichanie. Krztusiec jest wysoce zakaźną jednostką chorobową. Wskaźnik transmisji wśród wrażliwych domowników wynosi aż 90%, a w szkołach waha się pomiędzy 50–80%. Krztusiec może wystąpić w każdym wieku, chociaż najbardziej podatne są niemowlęta w ciągu pierwszych kilku tygodni lub miesięcy życia, wtedy też śmiertelność z powodu krztusca jest najwyższa. Przez wiele lat uważano, że zachorowanie na tę chorobę zapewnia odporność na całe życie. Przed wprowadzeniem powszechnych szczepień ochronnych, około 20% wszystkich zachorowań dotyczyło niemowląt poniżej 1 roku życia oraz blisko 60% dzieci w wieku od 1 do 4 lat. Kolejną grupę chorujących stanowiły osoby starsze narażone na kontakt z chorymi dziećmi [75].

Krztusiec objawia się charakterystycznym kaszlem napadowym utrzymującym się nawet do kilku tygodni. Przebieg choroby składa się z trzech charakterystycznych etapów: fazy kataralnej (nieżytowej), w której najczęściej dochodzi do zakażenia, fazy paroksyzmalnej oraz okresu rekonwalescencji. Okres inkubacji wynosi na ogół od 7 do 10 dni i przebiega z początkowymi objawami zakażenia górnych dróg oddechowych, z towarzyszącym zwykle nieżytem nosa, bólem gardła oraz stanem podgorączkowym. Kaszel, początkowo przerywany, postępuje w ciągu 1 lub 2 tygodni przekształcając się w napadowy. Częstotliwość i nasilenie kaszlu zwiększa się, a następnie napady stopniowo ustępują, przeważnie w okresie od 2 do 6 tygodni. Kaszel najczęściej pojawia się w nocy, towarzyszą mu duszności oraz wymioty. Napadowy kaszel, który występuje seriami charakteryzuje się głośnym świstem krtaniowym przypominającym „pianie koguta” (whooping). Niekiedy może dochodzić nawet do wylewów krwi do

spojówek i do powstania wybroczyn na twarzy chorego. U niemowląt może występować bezdech. Krztusiec przy nieodpowiednim leczeniu może doprowadzić do szeregu powikłań, w tym zapalenia ucha środkowego, zapalenia mózgu oraz zapalenia płuc. Wczesne rozpoznanie i rozpoczęcie leczenia krztusca mają istotne znaczenie w zapobieganiu śmierci u dzieci poniżej 5 roku życia [97]. Najczęściej stosowaną formą leczenia krztusca jest antybiotykoterapia. W przypadku dzieci niezaszczepionych lub nie w pełni uodpornionych, choroba może przybierać ciężki przebieg i wymagana jest hospitalizacja chorych. U dzieci z nietypowym, łagodniejszym przebiegiem choroby o wcześniej przebytej infekcji mogą świadczyć jedynie wyniki badań serologicznych [100]. Przed rozpowszechnieniem szczepień przeciwko krztuscowi sądzono, że tylko małe dzieci są podatne na krztusiec. Obecnie wiadomo, że dorośli również są narażeni na zakażenie, ale często przechodzą bezobjawową infekcję [75]. Większość pacjentów z pełnoobjawowym obrazem choroby wykazuje pewien stopień niedodmy lub odoskrzelowego zapalenia płuc, które może upośledzić funkcje układu oddechowego na tyle poważnie, że może nawet doprowadzić do śmierci. Obserwuje się agregację leukocytów w małych tętnicach płucnych, żyłach i naczyniach limfatycznych. Badania immunohistochemiczne potwierdzają obecność bakterii w rzęskach komórek nabłonka migawkowego tchawicy, oskrzeli i oskrzelików oraz w makrofagach [75]. Te obserwacje sugerują, że zapalenie płuc związane z krztuscem spowodowane jest przez nadmierną odpowiedź immunologiczną organizmu. Z komplikacji neurologicznych najczęściej występuje ostra encefalopatia krztuszcowa objawiająca się zaburzeniami świadomości, wynikająca zwykle z niedotlenienia lub krwawienia śródczaszkowego związanego z napadowym kaszlem. Według Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorób (CDC – Centers for Disease Control and Prevention) encefalopatia występuje u 0,4% dzieci w wieku poniżej 12 miesięcy hospitalizowanych z powodu krztusca. U około jednej trzeciej dzieci z encefalopatią krztuszcową dochodzi do trwałego uszkodzenia mózgu [75].

5. Epidemiologia

Krztusiec jest chorobą endemiczną, której wybuchy epidemii występują co 2 do 5 (zwykle 3 do 4) lat [35]. Pierwsza odnotowana epidemia krztusca, opisana przez Guillaume de Baillou, wydarzyła się latem 1578 roku w Paryżu i spowodowała wiele zgonów wśród niemowląt i małych dzieci. Nie obserwuje się sezonowości występowania zachorowań [75]. Wprowadzenie powszechnych szczepień przeciw krztuscowi u dzieci nie wpłynęło na zmianę cykliczności epidemii [14]. Szczepienia przyczyniły się do kontroli choroby lecz nie



Ryc. 1. Liczba przypadków krztuśca w Polsce w latach 1954–2018, na podstawie: [52, 57].

do opanowania rozprzestrzeniania się drobnoustroju w populacji [16]. Jednak późniejsze analizy przeprowadzone w Wielkiej Brytanii wykazały wydłużenie okresów pomiędzy wybuchami kolejnych epidemii w okresie stosowania szczepionek całokomórkowych [75]. Niemniej jednak oczywiste jest, że *B. pertussis* występuje endemicznie w populacji pomimo powszechnych programów szczepień.

Przed wprowadzeniem powszechnych szczepień ochronnych, krztusiec był jedną z głównych przyczyn śmiertelności wśród dzieci. Dla przykładu, w Stanach Zjednoczonych odnotowywano w tym czasie średnio aż 270 000 przypadków zachorowań na krztusiec rocznie, które doprowadzały do około 10 000 zgonów [16]. Wdrożenie całokomórkowej szczepionki przeciw krztuścowi przyniosło ogromne korzyści, w tym szybki spadek zachorowalności i umieralności z powodu krztuśca. Częstość występowania choroby była od 10 do 100 razy niższa w krajach, w których poziom zaszczepienia wynosił około 95%. W większości krajów liczba przypadków krztuśca spadła ze 100 przypadków na 100 000 mieszkańców w okresie przed wprowadzeniem szczepień do mniej niż 1 przypadku na 100 000 mieszkańców po ich wprowadzeniu. Globalnie liczba wszystkich przypadków krztuśca spadła z 3 mln zachorowań w 1974 roku do 100 000 – 200 000 zachorowań w latach 1993–1997 [52].

Rejestrację zachorowań na krztusiec w Polsce wprowadzono w 1919 roku. W latach 1920–1938 Polska należała do państw o najniższej zapadalności na tę chorobę,

która wynosiła 20–40 przypadków na 100 000 mieszkańców. Okres po II Wojnie Światowej można podzielić na trzy etapy: fazę epidemii krztuśca w latach 1952–1960, okres ciągłego spadku zachorowań w latach 1961–1989 i ponownego wzrostu liczby zgłaszanych przypadków w latach dziewięćdziesiątych. W szczytowym okresie epidemii w 1960 roku, zapadalność wynosiła 325,5 na 100 000 mieszkańców, z największą liczbą zgłoszonych przypadków wynoszącą 95 968. Najwyższa umieralność odnotowano w 1950 roku i wynosiła 6,3 na 100 000 mieszkańców (1580 zgonów). Powszechne szczepienia przeciw krztuścowi wprowadzono w Polsce w 1960 roku. W latach 1982–1992 osiągnięto prawie 100% spadek średniej zapadalności na krztusiec w stosunku do okresu 1950–1960 [52]. Najniższą zapadalność odnotowano w 1989 roku i wynosiła ona 0,28 na 100 000 mieszkańców. W 1992 roku zapadalność po raz pierwszy od 10 lat była wyższa niż 1 na 100 000 mieszkańców, a w 1998 roku wyniosła 7,4 [52]. Odnotowany w 1997 roku wzrost zachorowań na krztusiec był zaskoczeniem, gdyż program obowiązkowych szczepień przeciw krztuścowi krajową szczepionką DTP (Diphtheria-Tetanus-Pertussis) stosowano niezmiennie od 1960 roku, a średni poziom zaszczepienia w latach 1985–2000 nie zmienił się i przekraczał 95% [52]. Co więcej w Polsce w latach 90. nie doszło do zmian w diagnostyce choroby ani w systemie nadzoru epidemiologicznego, które mogłyby wpłynąć na zawyżenie rejestrowanej liczby przypadków. Powyższy trend

wzrostu zachorowań na krztusiec utrzymuje się do dzisiaj. W 2016 r. w Polsce liczba zachorowań na krztusiec była największa w ciągu ostatnich 20 lat. Według danych Zakładu Epidemiologii Chorób Zakaźnych i Nadzoru NIZP-PZH, w 2016 roku zarejestrowano 6856 zachorowań na krztusiec (zapadalność 17,84) pomimo, iż około 97,2% dzieci otrzymało podstawowe szczepienie przeciw krztuścowi [57, 90].

6. Zmienność genetyczna pałeczek *Bordetella pertussis*

Hipoteza dotycząca zmian genetycznych zachodzących w populacji bakterii *B. pertussis* pod wpływem presji selekcyjnej w postaci odpowiedzi immunologicznej indukowanej drogą powszechnie stosowanych szczepień przeciw krztuścowi została po raz pierwszy przedstawiona przez zespół prof. F. Mooi [67]. Szereg badań polimorfizmu sekwencji genów kodujących czynniki wirulencji wśród klinicznych izolatów *B. pertussis* przeprowadzonych przez zespoły badawcze z wielu krajów wykazało, że obecnie krążące izolaty są antygenowo odmienne od szczepów stosowanych do produkcji szczepionek całokomórkowych [12, 29, 69, 94]. Szczepy *B. pertussis* antygenowo odmienne od szczepów wchodzących w skład szczepionek mogą być potencjalnie mniej wrażliwe na działanie odpowiedzi odpornościowej indukowanej drogą szczepień. Adaptacja *B. pertussis* do rozprzestrzeniania się w populacjach o wysokim poziomie zaszczepienia może wpływać na obniżenie efektywności szczepień oraz wzrost zachorowań na krztusiec [38, 64]. Rozbieżność antygenowa pomiędzy szczepami szczepionkowymi a izolatami klinicznymi *B. pertussis* jest zjawiskiem obecnie obserwowanym globalnie [64]. Szereg badań wykonanych na modelu mysim wykazało, że szczepionki przeciw krztuścowi były mniej efektywne w eliminacji szczepów posiadających antygeny nieszczepionkowe [7, 49, 51].

Do tej pory opisano 13 alleli genu podjednostki S1 toksyny krztuścowej: *ptxA1-ptxA13*, kodujących 6 wariantów białka [65, 70]. Dla genu *ptxC*, kodującego podjednostkę S3 toksyny krztuścowej, dotychczas opisano trzy allele – *ptxC1*, *ptxC2*, *ptxC3*, kodujące trzy warianty białka [70]. Gen kodujący pertaktynę charakteryzuje się wysokim polimorfizmem. Dotychczas opisano 13 alleli (*prn1-prn13*), kodujących 13 wariantów białka Prn [65]. Sześć alleli (*tcfA1-tcfA6*), kodujących 6 wariantów białka TcfA, zidentyfikowano dla genu *tcfA* [64]. Dla genu *fim2* dotychczas opisano 2 allele – *fim2-1* oraz *fim2-2*, kodujące 2 warianty białka [65]. Z kolei dla genu *fim3* zidentyfikowano 6 alleli (*fim3-1-fim3-6*), kodujących cztery warianty białka [65]. Największą zmienność odnotowano w regionie promotora toksyny krztuścowej, dla którego do tej pory opisano

17 różnych typów (*ptxP1-ptxP17*) [65]. Polimorfizm promotora genu toksyny krztuścowej (*ptxP*) może być szczególnie istotny dla adaptacji pałeczek *B. pertussis*. Badania przeprowadzone przez zespół F. Mooi [66] wykazały, że izolaty *B. pertussis* posiadające allel *ptxP3* wytwarzają niemal dwukrotnie więcej toksyny krztuścowej w porównaniu do izolatów posiadających allel *ptxP1* i w związku z tym są bardziej wirulentne.

W wielu krajach o wysokim poziomie zaszczepienia populacji przeciw krztuścowi zaobserwowano ostatnio pojawienie się izolatów *B. pertussis*, które utraciły zdolność wytwarzania niektórych antygenów. Pojawienie się mutantów charakteryzujących się brakiem syntezy immunogenów szczepionkowych może być efektem naturalnej ewolucji *B. pertussis* lub może być mechanizmem adaptacyjnym umożliwiającym zwiększone krążenie pałeczek *B. pertussis* wśród osób zaszczepionych przeciw krztuścowi. Utrata zdolności wytwarzania immunogenów szczepionkowych wydaje się być szczególnie istotna w adaptacji pałeczek *B. pertussis* do odpowiedzi indukowanej przez szczepionki bezkomórkowe wywołujące wąski zakres odpowiedzi immunologicznej. Istnieją przypuszczenia, że pojawienie się izolatów *B. pertussis* niewytwarzających antygenów szczepionkowych może być wynikiem zastąpienia szczepionek całokomórkowych szczepionkami bezkomórkowymi [64].

Wśród mutantów *B. pertussis* niewytwarzających poszczególnych antygenów dominują izolaty niewytwarzające pertaktyny (Prn⁻). Szczepy (Prn⁻) wyizolowano we Francji, Finlandii, Holandii, Belgii, Danii, Norwegii, Szwecji, Wielkiej Brytanii, Włoszech, w Polsce, Izraelu, Kanadzie, USA, Australii oraz Japonii [76]. Przeprowadzone badania molekularne wykazały, że brak syntezy pertaktyny nie był wynikiem ekspansji pojedynczego klonu lecz był skutkiem powstania niezależnych mutacji. Opisano szereg mechanizmów takich jak: insercja IS481 lub IS1002 w gen kodujący Prn, delecja całego genu *prn* lub jego fragmentów, pojawienie się kodonu STOP w miejscu powodującym przedwczesne zakończenie syntezy białka, insercja guaniny do homopolimerycznego fragmentu poly(G) prowadząca do odwracalnego przesunięcia ramki odczytu w mechanizmie zmienności fazowej, inwersja części promotora *prn*, tranzycja G → A w pozycji -162 uniemożliwiająca transkrypcję genu *prn*, a także dotychczas niezidentyfikowane mutacje występujące poza promotorem oraz rejonem kodującym genu *prn* [76].

Wpływ utraty możliwości syntezy pertaktyny na transmisję i patogenezę pałeczek *B. pertussis* oraz na skuteczność szczepień przeciw krztuścowi nie został do końca poznany. Badania przeprowadzone przez zespół Bodilis i Guiso [6] wykazały, że infekcje wywoływane przez izolaty niewytwarzające pertaktyny u noworodków oraz dzieci poniżej 6 miesiąca życia przebiegały z typowym kaszlem napadowym. Dotychczas przeprowadzone

badani wskazują, że szczepy niewytwarzające pertaktyny nie wykazują obniżenia zdolności do adhezji i zakażenia komórek ssaków [25]. Wysoki odsetek tego typu izolatów sugeruje, że brak syntezy pertaktyny nie wpływa negatywnie na przeżywalność bakterii w populacjach o wysokim poziomie zaszczepienia przeciw krztuścowi. Dynamiczny wzrost częstości izolacji szczepów o fenotypie (Prn^-) wskazuje, że izolaty te zachowały zdolność transmisji wśród ludzi. Badania na modelu mysim wykazały, że izolaty, które nie wytwarzają pertaktyny są zdolne do przedłużenia infekcji w porównaniu ze szczepami wytwarzającymi Prn , co mogłyby zapewnić selektywną przewagę szczepom (Prn^-) [39].

Do chwili obecnej opisano 3 szczepy niewytwarzające toksyny krztuścowej (Ptx^-), z których jeden nie wytwarzał również pertaktyny (Prn^-). Dwa szczepy (Ptx^-) zostały wyizolowane we Francji, a szczep (Ptx^- ; Prn^-) w USA [9, 39, 96]. Mutacja odpowiedzialna za brak syntezy toksyny krztuścowej została poznana jedynie u dwóch szczepów i była związana z delecją operonu *ptx-ptl* obejmującego geny kodujące 5 podjednostek toksyny krztuścowej oraz geny odpowiedzialne za jej sekrecję [9, 96]. Wykazano, że izolaty (Ptx^-) nie utraciły zdolności do indukowania apoptozy makrofagów oraz do wnikania do komórek nabłonka tchawicy człowieka [9, 39]. W badaniu na modelu mysim wykazano, że mutanty (Ptx^-) były niezdolne do namnażania się w płucach myszy i wywołania efektu letalnego myszy zakażonych drogą donosową [9].

Na świecie zidentyfikowano dotychczas 2 szczepy *B. pertussis* niewytwarzające włóknikowej hemaglutyniny (FHA⁻). Obydwa mutanty zostały wyizolowane we Francji, jeden pochodził z okresu przed wprowadzeniem szczepień przeciw krztuścowi a drugi, niewytwarzający również pertaktyny, po wprowadzeniu szczepionek bezkomórkowych [39]. U pierwszego z tych szczepów zidentyfikowano kodon STOP w genie kodującym włóknikową hemaglutyninę natomiast brak ekspresji FHA przez drugi szczep był związany z pojawieniem się sekwencji insercyjnej w genie *fhaB* [39]. Badania przeprowadzone przez zespół Hegerle i wsp. [39] wykazały, że oba szczepy (FHA⁻) były cytotoksyczne wobec makrofagów oraz letalne dla myszy po eksperymentalnym zakażeniu donosowym.

Do tej pory opisano 3 izolaty niewytwarzające Fim 2 i Fim 3, z których dwa pochodziły z Japonii a jeden z Kanady i zostały wyizolowane w okresie powszechnego stosowania szczepionek bezkomórkowych [63, 87]. Nie wiadomo czy fenotyp (Fim^-) był wynikiem czasowego wyłączenia ekspresji genów w mechanizmie zmienności fazowej czy wynikał z mutacji skutkujących inaktywacją ekspresji genów *fim2* i *fim3*.

Dotychczas zidentyfikowane izolaty *B. pertussis* niewytwarzające czynnika kolonizacji tchawicy pochodziły z Belgii, Wielkiej Brytanii, Holandii, Polski i USA [74,

76, 93]. Przeprowadzone badania wykazały, że pojawienie się izolatów (TcfA⁻) było spowodowane wystąpieniem niezależnych mutacji w niepowiązanych epidemiologicznie genomach szczepów *B. pertussis* [93]. Opisano 2 typy mutacji odpowiedzialnych za wystąpienie fenotypu (TcfA⁻) – delecję genu *tcfA* oraz insercję/delecję pojedynczego nukleotydu G w obrębie homopolimerycznej sekwencji poly(G) skutkującą przesunięciem ramki odczytu genu *tcfA* i przedwczesnym zakończeniem syntezy białka [93].

7. Szczepionki całokomórkowe

Szczepionki całokomórkowe przeciw krztuścowi (wP – whole cell Pertussis) są zawiesinami całych inaktywowanych komórek *B. pertussis*. Po raz pierwszy zostały zarejestrowane w 1914 r. w Stanach Zjednoczonych (w Massachusetts Public Health Biological Laboratories). W 1943 r. komponent krztuścowy został skojarzony z toksoidem błoniczym i tężcowym w postaci szczepionki DTP, która w 1948 r. została zarejestrowana w Stanach Zjednoczonych [75].

W latach 30. w Stanach Zjednoczonych prowadzono intensywne badania nad szczepionkami przeciw krztuścowi. Przetestowano różne metody wytwarzania szczepionek m.in. zastosowanie przemytych lub nieprzemitych zawiesin inaktywowanych bakterii, szczepionki otrzymane metodą frakcjonowania, szczepionki odtoksyczone, a także szczepionki wzbogacone o „czynniki toksyczne” oraz szczepionki zawierające w składzie inne bakterie z układu oddechowego człowieka [75].

Wykazano, że skuteczność kliniczna szczepionek była zależna od liczby komórek *B. pertussis* zawartych w dawce szczepionki. W celu poprawy skuteczności szczepionek zwiększono liczbę komórek *B. pertussis* w pojedynczej dawce, zastosowano wystandaryzowane podłoża hodowlane, będące w I fazie wzrostu bakterie oraz delikatniejsze metody ich inaktywacji [75].

Ze względu na brak laboratoryjnych testów skuteczności szczepionek przeciw krztuścowi, efektywność pierwszych szczepionek była oceniana na podstawie wyników badań klinicznych [16]. Jedno z pierwszych badań klinicznych oceny szczepionki całokomórkowej zostało przeprowadzone przez Madsena podczas wybuchu dwóch epidemii krztuśca w 1923 i 1924 roku na Wyspach Owczych [55, 75]. Zastosowana w badaniu szczepionka, przygotowana przez Duński Instytut Sero-terapeutyczny w Kopenhadze, składała się z 48-godzinnej hodowli *B. pertussis* prowadzonej na podłożu Bordet-Gengou, zawieszona w roztworze soli zawierającej fenol, o stężeniu 10⁹ komórek/ml. Przeprowadzone badanie wykazało, że zastosowana szczepionka z reguły chroniła przed zachorowaniem, a u osób u których wystąpiła choroba, łagodziła jej objawy [55, 75].

Niezwykle zasłużone w badaniach nad krztuścem oraz szczepionkami przeciw krztuścowi były Pearl Kendrick i Grace Eldering. Badania rozpoczęte w 1932 r. w Grand Rapids, w stanie Michigan, w USA doprowadziły do opracowania i ulepszenia metody hodowli pałeczek *B. pertussis*, wprowadzenia sposobu inaktywacji bakterii za pomocą tiomersalu oraz opracowania szczepionki przeciw krztuścowi [47]. Początkowo produkowały one autogenne szczepionki przeciw krztuścowi dla miejscowych lekarzy, a ich bezpieczeństwo sprawdzały wstrzykując je we własne ramiona [47, 85]. Kendrick i Eldering przeprowadziły pierwsze na dużą skalę badanie kliniczne szczepionki przeciw krztuścowi [85]. W badaniu terenowym przeprowadzonym w latach 1934–1935 uczestniczyło 1592 dzieci (712 zaszczepionych i 880 z grupy kontrolnej). Badanie wykazało, że tylko 4 z 712 zaszczepionych dzieci zachorowało na krztusiec i tylko na łagodną postać choroby, natomiast w grupie nie poddanej immunizacji, 45 dzieci zachorowało na krztusiec o ciężkim przebiegu [47]. W 1938 r. Departament ds. Produktów Biologicznych zastosował opracowaną przez Kendrick i Eldering technologię do produkcji szczepionki przeciw krztuścowi na skalę masową dla dzieci w Michigan, a do 1940 r. szczepionka została użyta do powszechnych szczepień dzieci w całym Stanach Zjednoczonych [85]. W 1947 r. Kendrick i Eldering opracowały test do oceny efektywności szczepionek całokomórkowych przeciw krztuścowi przeprowadzany na myszach immunizowanych a następnie zakażanych domózgowo zjadliwym szczepem *B. pertussis* (tzw. test Kendrick) [48]. Test ten w sposób powtarzalny mierzy aktywność szczepionki skorelowaną ze skutecznością ochronną u ludzi i w wielu laboratoriach nadal jest stosowany.

Szczepionki przeciw krztuścowi produkowane w Stanach Zjednoczonych różniły się między sobą pod względem metod produkcji i generowały różne poziomy przeciwciał ochronnych [23], nie mniej jednak po ich wprowadzeniu nastąpił szybki spadek zachorowalności i śmiertelności z powodu krztuśca. Podczas gdy większość szczepionek DTwP była bardzo skuteczna (na poziomie 80–98%) [73], kilka zarejestrowanych tego typu szczepionek indukowało niską ochronę. Szczepionka DTwP produkowana przez Connaught Laboratories (obecnie Sanofi Pasteur, Toronto), stosowana w Kanadzie w latach 1985–1998, charakteryzowała się skutecznością na poziomie 49–61%. Szczepionka ta uzyskała niskie wskaźniki oceny skuteczności po trzech dawkach również w Szwecji (na poziomie 48%) oraz we Włoszech (na poziomie 36%) [36]. Stosowanie tej szczepionki uznano za główny czynnik odpowiedzialny za powrót zachorowań na krztusiec w Kanadzie w latach 90. [71]. Powrót choroby w Szwecji w latach 70. prawdopodobnie był związany z wcześniejszymi zmianami w procesie produkcji szwedzkiej szczepionki DTwP

[92]. Z kolei prawie natychmiastowy wzrost zachorowań na krztusiec w Szwecji po zaprzestaniu szczepień wskazuje na wysoką skuteczność szczepionek DTwP w ograniczaniu zachorowań [80].

Pomimo, że wyniki niektórych badań szczepionek wP przeprowadzonych w Europie wykazały zaskakująco niskie wskaźniki oceny skuteczności [41, 62], to jednak większość badań wykazała wysoką efektywność ochronną szczepionek wP [19, 68]. Ogólnokrajowe badania przeprowadzone w Wielkiej Brytanii w latach 1989–1990, wykazały wskaźniki skuteczności całokomórkowej szczepionki Wellcome (podawanej w 3, 5 i 10 miesiącu życia) na poziomie 87% i 93%, odpowiednio w okresach epidemicznych i nieepidemicznych [78]. Skuteczność szczepionki spadała wraz z upływem czasu od momentu immunizacji, ale utrzymywała się na wysokim poziomie do 8 roku życia. W 1994 r. przeprowadzono powtórne badanie w celu sprawdzenia czy skuteczność szczepionki Wellcome nie uległa zmianie w związku ze zmianą schematu immunizacji na podanie w 2, 3 i 4 miesiącu życia, bez późniejszej dawki przypominającej. Przeprowadzone badania wykazały, że skuteczność nie uległa zmianie i wynosiła 94% dla dzieci w wieku od 6 miesięcy do 5 lat [95].

Dowody na skuteczność szczepionki wP wynikają również z obserwacji, że zgłaszana zapadalność na krztusiec jest odwrotnie proporcjonalna do poziomu wyszczepialności. Badanie przeprowadzone w Anglii i Walii wykazało, że w regionach z niską akceptacją szczepień przeciw krztuścowi (<30%) odnotowano o 59% wyższą częstość występowania krztuśca wśród dzieci niż na obszarach o dużej (>50%) akceptacji szczepień [75]. W Stanach Zjednoczonych, gdzie szczepienia zaczęły być stosowane rutynowo pod koniec lat 40. XX wieku, krajowy nadzór wykazał ponad 95% spadek liczby zachorowań na krztusiec [13]. Dodatkowymi dowodami na skuteczność szczepionki wP są wybuchy epidemii krztuśca w populacjach nieimmunizowanych [14, 73].

Szczepionki zawierające całe komórki *B. pertussis* od dawna uznawane są za jedne z bardziej reaktogennych szczepionek. Reakcje miejscowe w postaci zaczerwienienia, obrzęku i bólu w miejscu wstrzyknięcia występują u około połowy dzieci poddanych szczepieniu DTwP. Reakcje te występują pięciokrotnie częściej po szczepionce DTwP w porównaniu do szczepionki DT. Podobnie, łagodne reakcje układowe, takie jak gorączka, drażliwość i senność są znacznie częstsze po DTwP niż po DT. Około 30% dzieci, które otrzymały szczepionkę wP doświadczyło niewielkiej gorączki po szczepieniu, ale tylko mniej niż 1% o temperaturze powyżej 40,5°C [18]. Przez pewien czas istniało poważne podejrzenie, że szczepionki całokomórkowe mogą być przyczynowo związane z wystąpieniem encefalopatii u dzieci, zespołem nagłej śmierci niemowląt (SIDS – Sudden

Infant Death Syndrome), czy zespołem hipotoniczno-hiporeaktywnym (HHE – Hypotonic Hyporesponsive Episode) [42]. Przeprowadzona metaanaliza wykazała jednak brak związku między szczepionką wP a ryzykiem wystąpienia poważnych zespołów chorobowych [42].

Obawy związane z bezpieczeństwem szczepionki DTwP nasiliły się w latach 70. i 80. XX wieku. W związku z brakiem zaufania do szczepień oraz w połączeniu z obniżającymi się wskaźnikami zachorowalności, w wielu krajach zaprzestano stosowania szczepionki całokomórkowej [16, 30], co doprowadziło do wzrostu liczby zachorowań na krztusiec [14, 50]. W innych krajach, takich jak Wielka Brytania, Włochy, Irlandia, Niemcy Zachodnie, Rosja i Australia odnotowano obniżenie poziomu zaszczepienia z powodu braku zgody rodziców na szczepienie [30]. W związku z negatywnym rozgłosem wokół zdarzeń niepożądanych wyszczepialność spadła z około 75% do prawie 25%, co skutkowało wystąpieniem poważnych epidemii krztuśca [16]. Począwszy od 1975 roku, po zaprzestaniu powszechnych szczepień w Japonii, nastąpił kolejny wybuch epidemii krztuśca, w wyniku którego setki dzieci zmarło [46]. Podobnie było w Anglii i Walii [16]. W Szwecji, gdzie szczepienie przeciw krztuścowi zostało zawieszono w 1979 r., częstość występowania krztuśca wzrosła ponad czterokrotnie w okresie 1980–1985 i doszło do poważnych epidemii w kolejnych latach [80].

Szczepionki całokomórkowe produkowane są lokalnie w wielu regionach świata. Ich produkcja jest stosunkowo niedroga dlatego są dostępne na całym świecie i dominują w krajach o niskim i średnim dochodzie, gdzie stosowane są w formie skojarzonej z antygenem błoniczym i tężcowym. Wykorzystywane są także szczepionki w postaci pięcioskładnikowej zawierające także antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (wzw B) oraz polisacharyd szczepu *Haemophilus influenzae* typu b. Szczepionki DTwP są standardem opieki w Afryce, w większości krajów Azji i wielu krajach Ameryki Łacińskiej [75]. Według danych WHO, 64% krajów na świecie nadal stosuje szczepionki wP przeciw krztuścowi, w tym 96% krajów Afryki i 100% krajów w regionie Azji Południowo-Wschodniej. Polska jest jedynym krajem europejskim, w którym nadal stosuje się szczepionkę DTwP do szczepienia podstawowego niemowląt [75].

W wytycznych WHO z września 2015 r. zalecono, aby kraje, które obecnie stosują szczepionki całokomórkowe nadal je stosowały, ponieważ dane z nadzoru epidemiologicznego sugerują, że stosowanie szczepionek bezkomórkowych może spowodować powrót krztuśca. Przejście ze szczepionki całokomórkowej na bezkomórkową może zostać rozważone tylko w przypadku zapewnienia szczepień przypominających oraz szczepień kobiet w ciąży [99].

8. Szczepionki bezkomórkowe

Poznanie patogenezы pałeczek *B. pertussis* pozwoliło na produkcję szczepionek bezkomórkowych (aP – acellular Pertussis) zawierających oczyszczone antygeny *B. pertussis*. Obecne szczepionki aP oparte są na różnych kombinacjach pięciu głównych antygenów *B. pertussis* takich jak toksyna krztuścowa, włókienkowa hemaglutynina, pertaktyna oraz dwa białka fimbrii (Fim 2 i Fim 3). Pierwsze szczepionki aP, opracowane przez Sato i współpracowników w Japonii, zawierały traktowaną formaldehydem FHA oraz inaktywowaną formaliną Ptx (JNIIH 6) i produkowane były przez japońskie firmy farmaceutyczne Takeda i Biken [82]. Przedmiotem badań była również szczepionka monowalentna zawierająca jedynie toksynę krztuścową (JNIIH 7). Szczepionki te podawane były dzieciom w wieku 2 lat i starszym. Skuteczność szczepionki JNIIH 6 została oszacowana na poziomie 78–92%, w zależności od liczby podanych dawek i wieku szczepionych dzieci [82]. Obie szczepionki zostały przetestowane również w Szwecji. Skuteczność po 2 dawkach u niemowląt wynosiła 69% dla szczepionki dwuskładnikowej (FHA i Ptx) i 54% dla szczepionki jednoskładnikowej (Ptx) [1]. W 1981 r. szczepionka aP została wprowadzona w Japonii do rutynowych szczepień przeciw krztuścowi [30]. W 1992 r. Amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA – Food & Drug Administration) zatwierdziła szczepionki aP do stosowania w ramach szczepienia przypominającego [13], a w 1996 r. szczepionki te zostały włączone do kalendarza szczepień do uodpornienia podstawowego niemowląt [83].

Pozytywne wyniki badań skuteczności japońskich szczepionek aP zachęciły inne uprzemysłowione kraje do badań nad opracowaniem nowych szczepionek bezkomórkowych. Opracowano wiele szczepionek aP, które różniły się od siebie pod względem liczby i stężenia poszczególnych antygenów, metod ich oczyszczania, stosowanych adiuwantów i substancji pomocniczych. W latach 90. przeprowadzono wiele badań klinicznych oceny skuteczności i bezpieczeństwa szczepionek bezkomórkowych. Były to jedne z największych i najdroższych badań klinicznych w historii szczepień. Trudno jednak porównywać uzyskane wyniki między sobą, ponieważ w badaniach zastosowano różne metodologie badawcze obejmujące różne schematy immunizacji i dawki oraz stosowano różne definicje przypadku krztuśca. Jako szczepionki odniesienia zastosowano charakteryzujące się różną skutecznością szczepionki całokomórkowe [33]. W styczniu 1991 r. WHO powołała grupę ekspertów w celu opracowania definicji przypadku krztuśca do stosowania w badaniach klinicznych. Według definicji WHO, aby stwierdzić, że przyczyną choroby jest krztusiec, kaszel musi trwać co najmniej 21 dni, a następnie choroba powinna

zostać potwierdzona w badaniach laboratoryjnych np. w wyniku pozytywnej hodowli pałeczek *B. pertussis* lub znacznego wzrostu przeciwciał IgG lub IgA przeciwko Ptx, FHA lub Fim-2 oraz Fim-3 [98].

Ze względu na to, że test domózgowego zakażenia myszy (test Kendrick) nie sprawdził się w przypadku oceny skuteczności szczepionek bezkomórkowych, rozpoczęto prace nad optymalizacją metody do oceny skuteczności szczepionek aP *in vitro* [35]. Próby donosowego zakażenia myszy prowadzone przez zespół Nicole Guiso dały obiecujące wyniki [34], jednak szersze zastosowanie okazał się mieć test ELISA służący do pomiaru u immunizowanych myszy poziomu przeciwciał swoistych dla poszczególnych antygenów zawartych w szczepionce.

Szczepionki DTaP początkowo stosowane były tylko do szczepień przypominających u dzieci, a następnie zostały wprowadzone do schematów szczepień podstawowych [24]. Zalecenia Doradczego Komitetu ds. Szczepień (USA) (ACIP – Advisory Committee on Immunisation Practices) dotyczące stosowania szczepionek DTaP jako czwartej i piątej dawki przypominającej wprowadzono w 1992 r. [13]. Z kolei, w 2006 r. wprowadzono dawkę przypominającą szczepionki dTap o zmniejszonej ilości antygenów błonniczego i krztuścowego dla nastolatków [10]. W 2011 r. ACIP wprowadził zalecenia immunizacji szczepionką dTap wszystkich kobiet w ciąży w celu ochrony noworodków przed krztuścem [75].

W większości krajów rozwiniętych, szczepionki całokomórkowe zostały wyparte przez szczepionki bezkomórkowe. Szczepionki DTaP całkowicie zastąpiły szczepionki DTwP w Stanach Zjednoczonych, Kanadzie, Australii, Nowej Zelandii, w Europie (z wyjątkiem Polski) oraz w niektórych krajach Azji i Ameryki Łacińskiej i są powszechnie stosowane w sektorze prywatnym na całym świecie. Z krajów afrykańskich tylko Mauritius i kraje południowej części Afryki używają szczepionek bezkomórkowych. W każdym kraju schemat szczepień przeciw krztuścowi obejmuje trzy dawki szczepionki w pierwszych 6 miesiącach życia. W części krajów stosowana jest dawka przypominająca w drugim roku życia, a tylko w nielicznych krajach stosuje się kolejną dawkę przypominającą dla dzieci w wieku od 4 do 6 lat [75]. W 2006 roku na całym świecie wyprodukowano ponad 500 milionów dawek szczepionek zawierających w swoim składzie składnik krztuścowy, z czego ponad 100 milionów dawek pochodziło z dwóch największych koncernów farmaceutycznych – Sanofi Pasteur i GSK [75].

W Polsce, do uodpornienia podstawowego niemowląt i małych dzieci nadal stosuje się szczepionkę DTwP. Szczepionka bezkomórkowa jest dostępna w Polsce od 1998 roku i refundowana jest do szczepienia podstawowego niemowląt jedynie dla wcześniaków i noworod-

ków urodzonych z niską masą urodzeniową tj. poniżej 2500 gramów. Pomimo braku refundacji szacuje się, że obecnie ponad połowa polskich rodziców wybiera odpłatne szczepionki ze składnikiem aP [89]. W 2004 r. do szczepień obowiązkowych w Programie Szczepień Ochronnych wprowadzono dawkę przypominającą szczepionki aP dla dzieci w 6 roku życia, a w 2016 r. wprowadzono kolejną dawkę przypominającą dla nastolatków w wieku 14 lat. Istnieją zalecenia dotyczące szczepień przeciw krztuścowi personelu oddziałów neonatologicznych i pediatrycznych, kobiet w ciąży, nastolatków w wieku 19 lat, osób w wysokim stopniu narażonych na zakażenie oraz osób dorosłych co 10 lat. Schemat szczepień przeciw krztuścowi w Polsce obejmuje podawanie kolejnych dawek szczepionki DTwP lub DTaP dzieciom w wieku 2, 3–4, 5–6, 16–18 miesięcy oraz szczepionki DTaP w 6 roku życia. Szczepionki przeciw krztuścowi bezkomórkowe i całokomórkowe charakteryzują się różnymi profilami bezpieczeństwa. W przypadku szczepionek DTaP obserwowanych jest mniej niepożądanych reakcji miejscowych, takich jak zaczerwienienie, obrzęk, ból w miejscu wstrzyknięcia oraz mniej reakcji ogólnoustrojowych, takich jak gorączka i uporczywy płacz [18].

9. Nowe szczepionki przeciw krztuścowi

W celu uzyskania lepszej kontroli nad zakażeniami na krztusiec niezbędne jest udoskonalanie obecnie stosowanych szczepionek lub opracowanie nowych szczepionek w celu wydłużenia czasu trwania odporności poszczepiennej. Zaproponowano różne podejścia w tym: nową formułą obecnie istniejących szczepionek bezkomórkowych poprzez dodanie nowych adiuwantów wzmacniających odpowiedź zależną od Th1 lub Th17, włączenie nowych antygenów pałeczek *B. pertussis* zawierających więcej natywnych struktur bez modyfikacji chemicznych, a także opracowanie szczepionek opartych na pęcherzykach błony zewnętrznej lub żywych, atenuowanych bakteriami [21].

Wśród badanych potencjalnych nowych antygenów szczepionkowych są m.in. ekspozowane na powierzchni pałeczek *B. pertussis* unikalne wysoce immunogenne białka IRP1-3 i AfuA, które są zaangażowane w wychwyty żelaza. Włączenie białka IRP1-3 i rekombinowanej formy białka AfuA do eksperymentalnej szczepionki powodowało skuteczniejszą ochronę myszy w porównaniu do szczepionki niezawierającej tych białek [3]. Innym potencjalnym antygenem szczepionkowym jest rekombinowana forma cykazy adenylowej pozbawiona aktywności enzymatycznej. Badania na modelu mysim wykazały, że immunizacja rekombinowaną formą ACT powodowała wzrost ochrony przed donosowym zakażeniem pałeczkami *B. pertussis* i indukowanie odpowiedzi

immunologicznej zarówno o profilu Th1, jak i Th2 [17]. Przedmiotem badań jest również białko błony komórkowej BipA oraz białko BrkA. Immunizacja myszy rekombinowanym białkiem BipA aktywowała przeciwciała opsonizujące i znacznie ograniczyła kolonizację płuc myszy przez pałeczki *B. pertussis* [20]. Badania na modelu mysim wykazały, że samo podanie będącego autotransporterem białka BrkA nie chroni znacząco myszy przed zakażaniem *B. pertussis*, ale dodanie go do obecnych w szczepionkach antygenów Ptx i FHA zwiększa znacznie ochronę przed kolonizacją płuc pałeczkami *B. pertussis* podanymi drogą donosową. Wykazano również, że genetycznie odtoksyczniona toksyna krztuścowa jest bardziej immunogenna niż chemicznie unieczynniona, co przekłada się na uzyskanie wyższego miana przeciwciał neutralizujących oraz silniejszej odpowiedzi Th1/Th17 [84].

W badaniach na modelu mysim wykazano, że pęcherzyki błony zewnętrznej (OMV – Outer Membrane Vesicles) zawierające powierzchniowe białka antygenowe pałeczek *B. pertussis* są bezpieczne i wysoce immunogenne [8]. Profil bezpieczeństwa szczepionek OMV jest porównywalny do szczepionek aP i znacznie lepszy od szczepionek wP [81]. Fernandez i wsp. [27] wykazali, że preparat proteoliposomowy pochodzący z *B. pertussis* indukuje ochronę u 90% myszy przed letalną infekcją *B. pertussis* i z czasem powoduje całkowitą eliminację bakterii podanych drogą domózgową i donosową. Szczepionka OMV indukuje odpowiedź immunologiczną o mieszanym profilu Th1/Th17 i Th2 z silną odpowiedzią humoralną [8]. Ponadto wykazano, że szczepionka OMV chroni przed zróżnicowanymi genetycznie izolatami *B. pertussis* także tymi, które nie wytwarzają pertaktyny [11]. Innym podejściem jest zastosowanie pęcherzyków błony zewnętrznej zawierających antygeny powierzchniowe, takie jak Prn i Ptx. Roberts i współpracownicy wykazali, że donosowe lub śródtrzewne podawanie pęcherzyków błony zewnętrznej indukuje ochronę przed zakażeniem krztuścem u myszy [79].

W obecnie zarejestrowanych szczepionkach bezkomórkowych, jako adiuwanty powszechnie stosowane są związki glinu w postaci wodorotlenku glinu i fosforanu glinu. Ich rola polega na zwiększaniu efektywności odpowiedzi immunologicznej indukowanej przez zawarte w szczepionce antygeny przez m.in. wywoływanie efektu depot w miejscu wstrzyknięcia, aktywację układu dopełniacza, stymulację makrofagów oraz wzmacnianie aktywności odpowiedzi limfocytów szlaku Th2. Ze względu na fakt, że kluczową rolę w skutecznej eliminacji pałeczek *B. pertussis* odgrywa odpowiedź typu Th1, rozpoczęto badania nad adiuwantami nowej generacji, wzmacniającymi aktywność limfocytów Th1 [53]. Badania przeprowadzone przez Polewicz i wsp. [77] wykazały, że zastosowanie jako

adiuwantów krótkich, jednoniciowych, syntetycznych cząsteczek DNA zawierających wyspy CpG, indukuje wyższe poziomy przeciwciał IgG2a i IgA oraz wzmacnia odpowiedź typu Th1 u myszy. Ponadto, pomagają one przełamać supresję pierwotnej odpowiedzi na toksynę krztuścową u niemowląt posiadających przeciwciała pochodzenia matczyne [77]. Motywy CpG ze względu na ich obfitość w genomach drobnoustrojów, ale rzadkość w genomach kręgowców, uważane są za wzory cząsteczkowe związane z patogenami PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) i są selektywnie rozpoznawane przez mechanizmy nieswoistej odpowiedzi wrodzonej i uruchamiają proces zwalczania infekcji. W innych badaniach testowano lipoproteinę z *B. pertussis* [22], adiuwant emulsyjny MF59 [2], syntetyczny peptyd regulujący mechanizmy wrodzonej odporności [32], monofosforylolid A oraz wiele innych cząsteczek immunostymulujących [4, 31, 86]. Wszystkie powyżej testowane adiuwanty, poprzez podobieństwo do struktur charakterystycznych dla drobnoustrojów chorobotwórczych, rozpoznawane są dzięki specyficznym receptorom znajdujących się na powierzchni leukocytów. Do takich receptorów zalicza się receptory Toll-like (TLR), które m.in. inicjują nabytą odpowiedź immunologiczną przez aktywację komórek dendrytycznych [5].

Najbardziej zaawansowana w badaniach jest szczepionka BPZE1 zawierająca żywe, atenuowane komórki bakteryjne. Substancją czynną szczepionki jest szczep *B. pertussis* pozbawiony toksyczności poprzez genetyczną inaktywację trzech toksyn tj. toksyny krztuścowej, toksyny dermonekrotycznej i cytotoksyny tchawiczej [61]. Wykazano, że zdolność do kolonizacji płuc myszy przez szczep BPZE1 jest podobna do zdolności szczepu macierzystego. W przeciwieństwie do zjadliwego szczepu rodzicielskiego, szczep BPZE1 nie indukuje zmian w płucach u myszy po podaniu donosowym [54, 61]. Stabilność genetyczną szczepu BPZE1 oceniano po kilku pasażach *in vitro* i *in vivo* [28]. Bezpieczeństwo szczepionki BPZE1 zostało potwierdzone w kilku badaniach przedklinicznych [53]. Badania na modelu mysim dowodzą, że jedna dawka szczepionki chroni przed kolonizacją bakterii w płucach [60]. Wykazano, że pojedyncze podanie szczepionki BPZE1 indukuje poziom przeciwciał porównywalny do poziomu obserwowanego po dwóch dawkach szczepionki aP [61]. Szczepionka BPZE1 podana donosowo indukuje zarówno śluzówkową, jak i ogólnoustrojową odpowiedź immunologiczną, która wzbudza szybką i szerszą odporność w porównaniu do szczepionek podawanych domięśniowo. Wykazano, że indukowana przez szczepionkę BPZE1 ochrona przed kolonizacją płuc po zakażeniu *B. pertussis* jest długotrwała i znacznie silniejsza w porównaniu do ochrony wzbudzonej przez szczepionkę bezkomórkową [28].

Co więcej, szczepionka ta zapewnia szybszą ochronę przed zachorowaniem w porównaniu do szczepionek aP [53]. Wykazano, że skuteczność szczepionki BPZE1 w indukowaniu przeciwciał przeciwko antygenom *B. pertussis*, a także w wytwarzaniu swoistego antygenowo IFN- γ zależy od użytej dawki [60]. Okazało się, że szczepionka BPZE1 zapewnia ochronę również przed bakteriami *Bordetella bronchiseptica* [45]. Badania przeprowadzone na modelu pawiana wykazały, że szczep BPZE1 przejściowo kolonizuje jamę nosowo-gardłową [54]. Donosowa droga podania szczepionki stymuluje miejscową odporność na poziomie błony śluzówkowej, co zapobiega kolonizacji przez bakterie *B. pertussis*. W efekcie, szczepionka BPZE1 zapewnia ochronę nie tylko przed zachorowaniem, ale też przed kolonizacją. Ochrona ta jest bardzo podobna do odporności po naturalnej infekcji. Wykazano, że kolonizacja przez zjadliwy szczep płuc pawianów zaszczepionych szczepionką BPZE1 została zmniejszona o 99,998% w porównaniu z nieszczepionymi pawianami [54]. Obecnie stosowane szczepionki aP i wP nie eliminują nosicielstwa. Otrzymane wyniki są o tyle obiecujące, że BPZE1 może zapobiegać kolonizacji, a co za tym idzie blokować transmisję *B. pertussis* w populacji. Badanie przedkliniczne wykazało, że BPZE1 sprzyja indukowanej chemokinami CCL migracji komórek dendrytycznych i stymuluje odpowiedź typu Th1/Th17 [26]. W badaniach na myszach dowiedziono, że szczepionka BPZE1 stymuluje odpowiedzi przeciwciał porównywalne do szczepionek acelularnych [61]. Szczepionka BPZE1 w swoich właściwościach immunologicznych zbliżona jest do właściwości szczepionki całokomórkowej, a swoim bezpieczeństwem przypomina szczepionkę aP [53]. Myszy immunizowane żywym, atenuowanym szczepem były chronione przez co najmniej 1 rok po immunizacji co sugeruje, że szczepionka ta może zapewniać również ochronę długoterminową [88]. Badanie kliniczne fazy I przeprowadzone na dorosłych mężczyznach wykazało, że szczepionka BPZE1 jest bezpieczna i immunogenna [91]. Obecnie trwają badania kliniczne fazy II szczepionki BPZE1 [89].

10. Podsumowanie

Od połowy XX wieku szczepionki wywarły znaczący wpływ na zdrowie publiczne, kontrolując rozprzestrzenianie się wielu chorób zakaźnych na całym świecie. Prowadzone masowo szczepienia ukierunkowały proces zmienności bakterii *B. pertussis* na wyeliminowanie z populacji szczepionkowych wariantów tego drobnoustroju. Początkowo do produkcji szczepionek przeciw krztuścowi stosowano od kilku do kilkunastu szczepów na bieżąco izolowanych od chorych [52]. Wydaje się, że gdyby proces wytwarzania szczepionek opierał się

na ww. strategii, częstość izolacji szczepów *B. pertussis* o wcześniej niespotykanych genotypach byłaby zdecydowanie niższa. Można przypuszczać, że stosowanie szczepionek bezkomórkowych indukujących bardziej swoiste spektrum przeciwciał może nasilać ekspansję szczepów coraz bardziej odmiennych antygenowo. Stabilność ewolucyjna składnika zakaźnego wydaje się być ważna szczególnie wśród chorób kontrolowanych za pomocą szczepień. W przypadku gdy szczepionki oparte będą o izolaty cechujące się najwyższą zjadliwością, z populacji eliminowane będą drobnoustroje charakteryzujące się najwyższym zagrożeniem chorobotwórczym. Z kolei, jeśli stosowane szczepionki oparte będą o antygeny szczepów o nie w pełni określonej lub mniejszej zjadliwości, w populacji mogą rozprzestrzeniać się szczepy potencjalnie bardziej zjadliwe. W związku z niekorzystnymi zmianami w epidemiologii krztuśca w krajach, które od dziesięcioleci utrzymywały wysoki poziom zaszczepienia, rozpoczęto próby nad optymalizacją strategii ograniczenia zachorowań m.in. wprowadzono zalecenia do powszechnych szczepień młodzieży i osób dorosłych, kobiet w ciąży, czy osób mających bliski kontakt z noworodkami [99]. Wiadomym jest, że kontrola zachorowań na krztusiec nie jest możliwa przez podawanie szczepionek wyłącznie dzieciom, ponieważ następuje spadek odporności w miarę upływu czasu od podania ostatniej dawki szczepionki. Szczepienia zapobiegają rozwojowi choroby, a nie zakażeniu, a osoby dorosłe biorą udział w transmisji zakażeń [15]. Rosnąca liczba zachorowań stłumiła entuzjazm wynikający z powszechnego wprowadzenia szczepionek bezkomórkowych, jako bezpieczniejszej alternatywy. Szczepionki całokomórkowe, poza Polską, nie są już stosowane w Europie, a im dłuższy okres czasu upłynął od ich wycofania z programów szczepień, tym bardziej problem wzrostu liczby zachorowań zaczął się nasilać. Należy również podkreślić, że realna skala zachorowań może być zdecydowanie wyższa, ponieważ diagnostyka obejmuje przypadki o typowych objawach klinicznych. Najprawdopodobniej w starszych grupach wiekowych, gdzie choroba przybiera łagodniejszy przebieg, pozostaje ona niezdiagnozowana [15].

Piśmiennictwo

1. Ad Hoc Group for the Study of Pertussis Vaccines.: Placebo-controlled trial of two acellular pertussis vaccines in Sweden: protective efficacy and adverse events. *Lancet*, **1**, 955–960 (1988)
2. Agnolon V., Bruno C., Leuzzi R., Galletti B., D'Oro U., Pizza M., Seubert A., O'Hagan D., Baudner B.: The potential of adjuvants to improve immune responses against TdaP vaccines: A preclinical evaluation of MF59 and monophosphoryl lipid A. *Int. J. Pharm.* **492**, 169–176 (2015)
3. Alvarez Hayes J., Erben E., Lamberti Y., Principi G., Maschi F, Ayala M, Rodriguez M.: *Bordetella pertussis* iron regulated proteins as potential vaccine components. *Vaccine*, **31**, 3543–3548 (2013)

4. Asokanathan C., Corbel M., Xing D.: A CpG-containing oligodeoxynucleotide adjuvant for acellular pertussis vaccine improves the protective response against *Bordetella pertussis*. *Hum. Vaccin. Immunother.* **9**, 325–331 (2013)
5. Bernard N., Finlay C Tannahill G., Cassidy J., O'Neill L., Mills K.: A critical role for the TLR signaling adapter Mal in alveolar macrophage-mediated protection against *Bordetella pertussis*. *Mucosal Immunol.* **8**, 982–992 (2015)
6. Bodilis H., Guiso N.: Virulence of pertactin-negative *Bordetella pertussis* isolates from infants, France. *Emerg. Infect. Dis.* **19**, 471–474 (2013)
7. Bottero D., Hozbor D. i wsp.: Pulsed-field gel electrophoresis, pertactin, pertussis toxin S1 subunit polymorphisms, and surfaceome analysis of vaccine and clinical *Bordetella pertussis* strains. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 1490–1498 (2007)
8. Bottero D., Hozbor D. i wsp.: Characterization of the immune response induced by pertussis OMVs-based vaccine. *Vaccine*, **34**, 3303–3309 (2016)
9. Bouchez V., Hegerle N., Strati F., Njamkepo E., Guiso N.: New data on vaccine antigen deficient *Bordetella pertussis* isolates. *Vaccines*, **3**, 751–770 (2015)
10. Broder K., Cortese M., Iskander J.: Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Preventing tetanus, diphtheria, and pertussis among adolescents: use of tetanus toxoid, reduced diphtheria toxoid and acellular pertussis vaccines. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm. Rep.* **55**, 1–34 (2006)
11. Carbonetti N.: *Bordetella pertussis*: new concepts in pathogenesis and treatment. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **29**, 287–294 (2016)
12. Cassidy P., Sanden G., Heuvelman K., Mooi F., Bisgard K., Popovic T.: Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935–1999. *J. Infect. Dis.* **182**, 1402–1408 (2000)
13. Centers for Disease Control and Prevention.: Pertussis-United States, January 1992–June 1995. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **44**, 525–529 (1995)
14. Cherry J.: The epidemiology of pertussis and pertussis immunization in the United Kingdom and the United States: a comparative study. *Curr. Probl. Pediatr.* **14**, 1–78 (1984)
15. Cherry J.: Epidemic pertussis and acellular pertussis vaccine failure in the 21st century. *Pediatrics*, **135**, 1130–1132 (2015)
16. Cherry J., Brunell P., Golden G.: Report of the task force on pertussis and pertussis immunization – 1988. *Pediatrics*, **81**, 939–984 (1988)
17. Cheung G., Xing D., Prior S., Corbel M., Parton R., Coote J.: Effect of different forms of adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* on protection afforded by an acellular pertussis vaccine in a murine model. *Infect. Immun.* **74**, 6797–6805 (2006)
18. Cody C., Baraff L., Cherry J., Marcy S., Manclark C.: Nature and rates of adverse reactions associated with DTP and DT immunizations in infants and children. *Pediatrics*, **68**, 650–660 (1981)
19. Cvjetanovic B., Grab B., Uemura K.: Diphtheria and whooping cough: diseases affecting a particular age group. *Bull. World Health Organ.* **56**, 103–133 (1978)
20. de Gouw D., Serra D., de Jonge M., Hermans P., Wessels H., Zomer A., Yantorno O., Diavatopoulos D., Mooi F.: The vaccine potential of *Bordetella pertussis* biofilm-derived membrane proteins. *Emerg. Microbes Infect.* **3**, e58 (2014)
21. Diavatopoulos D., Edwards K.: What is wrong with Pertussis vaccine immunity? Why immunological memory to Pertussis is failing. *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* **9**, a029553 (2017)
22. Dunne A., Mielke L., Allen A., Sutton C., Higgs R., Cunningham C., Higgs S., Mills K.: A novel TLR2 agonist from *Bordetella pertussis* is a potent adjuvant that promotes protective immunity with an acellular pertussis vaccine. *Mucosal Immunol.* **8**, 607–617 (2015)
23. Edwards K., Decker M., Halsey N., Koblin B., Townsend T., Auerbach B., Karzon D.: Differences in antibody response to whole-cell pertussis vaccines. *Pediatrics*, **88**, 1019–1023 (1991)
24. Edwards K., Deloria M. i wsp.: Comparison of 13 acellular pertussis vaccines: overview and serologic response. *Pediatrics*, **96**, 548–557 (1995)
25. Fedele G., Bianco M., Ausiello C.: The virulence factors of *Bordetella pertussis*: talented modulators of host immune response. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **61**, 445–457 (2013)
26. Fedele G., Bianco M., Debie A., Loch C., Ausiello C.: Attenuated *Bordetella pertussis* vaccine candidate BPZE1 promotes human dendritic cell CCL21-induced migration and drives a Th1/Th17 response. *J. Immunol.* **186**, 5388–5396 (2011)
27. Fernández S., Pérez J. i wsp.: A proteoliposome formulation derived from *Bordetella pertussis* induces protection in two murine challenge models. *BMC Immunol.* **14**, S8 (2013)
28. Feunou P., Ismaili J., Debie A., Huot L., Hot D., Raze D., Lemoine Y., Loch C.: Genetic stability of the live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine candidate BPZE1. *Vaccine*, **26**, 5722–5727 (2008)
29. Fry N., Neal S., Harrison T., Miller E., Matthews R., George R.: Genotypic variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertactin and pertussis toxin in historical and recent clinical isolates in the United Kingdom. *Infect. Immun.* **69**, 5520–5528 (2001)
30. Gangarosa E., Galazka A., Wolfe C., Phillips L., Gangarosa R., Miller E., Chen R.: Impact of anti-vaccine movements on pertussis control: the untold story. *Lancet*, **351**, 356–361 (1998)
31. Garlapati S., Gerdtts V. i wsp.: Immunization with PCEP micro-particles containing pertussis toxoid, CpG ODN and a synthetic innate defense regulator peptide induces protective immunity against pertussis. *Vaccine*, **29**, 6540–6548 (2011)
32. Gracia A., Polewicz M., Halperin S., Hancock R., Potter A., Babiuk L., Gerdtts V.: Antibody responses in adult and neonatal BALB/c mice to immunization with novel *Bordetella pertussis* vaccine formulations. *Vaccine*, **29**, 1595–1604 (2011)
33. Greco D., Salmaso S., Mastrantonio P., Giuliano M., Tozzi A., Anemona A.: A controlled trial of two acellular vaccines and one whole-cell vaccine against pertussis. Progetto Pertosse Working Group. *N. Engl. J. Med.* **334**, 341–348 (1996)
34. Guiso N., Capiou C., Carletti G., Poolman J., Hauser P.: Intranasal murine model of *Bordetella pertussis* infection. I. Prediction of protection in human infants by acellular vaccines. *Vaccine*, **17**, 2366–2376 (1999)
35. Guris D., Strebel P., Bardenheier B., Brennan M., Tachdjian R., Finch E., Wharton M., Livengood J.: Changing epidemiology of pertussis in the United States: increasing reported incidence among adolescents and adults, 1990–1996. *Clin. Infect. Dis.* **28**, 1230–1237 (1999)
36. Gustafsson L., Hallander H. O., Olin P., Reizenstein E., Storsaeter J.: A controlled trial of a two-component acellular, a five-component acellular, and a whole-cell pertussis vaccine. *N. Engl. J. Med.* **334**, 349–355 (1996)
37. He Q., Mäkinen J., Berbers G., Mooi F., Viljanen M., Arvilommi H., Mertsola J.: *Bordetella pertussis* protein pertactin induces type-specific antibodies: one possible explanation for the emergence of antigenic variants? *J. Infect. Dis.* **187**, 1200–1205 (2003)
38. He Q., Mertsola J.: Factors contributing to pertussis resurgence. *Future Microbiol.* **3**, 329–339 (2008)
39. Hegerle N., Dore G., Guiso N.: Pertactin deficient *Bordetella pertussis* present a better fitness in mice immunized with an acellular pertussis vaccine. *Vaccine*, **32** (2014)
40. Hewlett E.: Pertussis: current concepts of pathogenesis and prevention. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **16**, 78–84 (1997)

41. Hinman A., Koplan J.: Pertussis and pertussis vaccine. Reanalysis of benefits, risks, and costs. *JAMA*, **251**, 3109–3113 (1984)
42. Howson C., Fineberg H.: Adverse events following pertussis and rubella vaccines. Summary of a report of the Institute of Medicine. *JAMA*, **267**, 392–396 (1992)
43. Jenkinson D.: Duration of effectiveness of pertussis vaccine: evidence from a 10 year community study. *Brit. Med. J.* **296**, 612–614 (1988)
44. Jones A., Boucher P., Williams C, Stibitz S., Cotter P.: Role of BvgA phosphorylation and DNA binding affinity in control of Bvg-mediated phenotypic phase transition in *Bordetella pertussis*. *Mol. Microbiol.* **58**, 700–713 (2005)
45. Kammoun H., Feunou P., Foligne B., Debie A., Raze D., Mielcarek N., Loch C.: Dual mechanism of protection by live attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1 against *Bordetella bronchiseptica* in mice. *Vaccine*, **30**, 5864–5870 (2012)
46. Kanai K.: Japan's experience in pertussis epidemiology and vaccination in the past thirty years. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **33**, 107–143 (1980)
47. Kendrick P., Eldering G.: Progress report on pertussis immunization. *Am. J. Public Health*, **26**, 8–12 (1936)
48. Kendrick P., Eldering G., Dixon M. K., Misner J.: Mouse protection tests in the study of pertussis vaccines: a comparative series using the intracerebral route of challenge. *Am. J. Public Health*, **37**, 803–810 (1947)
49. King A., Berbers G., van Oirschot H., Hoogerhout P., Knipping K., Mooi F.: Role of the polymorphic region 1 of the *Bordetella pertussis* protein pertactin in immunity. *Microbiology*, **147**, 2885–2895 (2001)
50. Klein N.: Licensed pertussis vaccines in the United States. History and current state. *Hum. Vacc. Immunother.* **10**, 2684–2690 (2014)
51. Komatsu E., Yamaguchi F., Abe A., Weiss A., Watanabe M.: Synergic effect of genotype changes in pertussis toxin and pertactin on adaptation to an acellular pertussis vaccine in the murine intranasal challenge model. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**, 807–812 (2010)
52. Kostrzewski J., Magdzik W., Naruszewicz-Lesiuk D.: Choroby zakaźne i ich zwalczanie na ziemiach polskich w XX wieku. PZWL, Warszawa, 2001.
53. Loch C., Mielcarek N. New pertussis vaccination approaches: en route to protect newborns? *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **66**, 121–133 (2012)
54. Loch C., Papin J., Lecher S., Debie A., Thalen M., Solovay K., Rubin K., Mielcarek N.: Live Attenuated pertussis vaccine BPZE1 protects baboons against *Bordetella pertussis* disease and infection. *J. Infect. Dis.* **216**, 117–124 (2017)
55. Madsen T.: Vaccination against whooping cough. *JAMA*, **101**, 187–188 (1933)
56. Mattoo S., Cherry J.: Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 326–382 (2005)
57. Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne, zakażeniach i zatruciach w Polsce, NIZP-PZH. Strona http://www.wold.pzh.gov.pl/oldpage/epimeld/index_p.html (10.08.2019).
58. Melvin J., Scheller E., Miller J., Cotter P.: *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 274–288 (2014)
59. Merkel T., Stibitz S., Keith J., Leef M., Shahin R.: Contribution of regulation by the *bvg* locus to respiratory infection of mice by *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* **66**, 4367–4373 (1998)
60. Mielcarek N., Debie A., Mahieux S., Loch C.: Dose response of attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1-induced protection in mice. *Clin. Vaccine Immunol.* **17**, 317–324 (2010)
61. Mielcarek N., Loch C. i wsp.: Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog.* **2**, e65 (2006)
62. Miller D., Alderslade R., Ross E.: Whooping cough and whooping cough vaccine: the risks and benefits debate. *Epidemiol. Rev.* **4**, 1–24 (1982)
63. Miyaji Y., Otsuka N., Toyozumi-Ajisaka H., Shibayama K., Kamachi K.: Genetic analysis of *Bordetella pertussis* isolates from the 2008–2010 pertussis epidemic in Japan. *PLoS One*, **8**, e77165 (2013)
64. Mooi F.: *Bordetella pertussis* and vaccination: the persistence of a genetically monomorphic pathogen. *Infect. Genet. Evol.* **10**, 36–49 (2010)
65. Mooi F., Van Der Maas N., De Melker H.: Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation - two sides of the same coin. *Epidemiol. Infect.* **142**, 685–694 (2014)
66. Mooi F., Mertsola J. i wsp.: *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1206–1213 (2009)
67. Mooi F., van Oirschot H., Heuvelman K., van der Heide H., Gaastra W., Willems R.: Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect. Immun.* **66**, 670–675 (1998)
68. Mortimer E., Jones P.: An evaluation of pertussis vaccine. *Rev. Infect. Dis.* **1**, 927–934 (1979)
69. Mosiej E., Augustynowicz E., Zawadka M., Dąbrowski W., Lutyńska A.: Strain variation among *Bordetella pertussis* isolates circulating in Poland after 50 years of whole-cell pertussis vaccine use. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 1452e7 (2011)
70. Mosiej E., Zawadka M., Krysztopa-Grzybowska K., Polak M., Augustynowicz E., Piekarska K., Lutyńska A.: Sequence variation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from Poland in the period 1959–2013. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**, 147e52 (2015)
71. Nteyayabo B., De Serres G., Duval B.: Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **22**, 22–27 (2003)
72. Olin P., Gustafsson L., Barreto L., Hessel L., Mast T., Rie A., Bogaerts H., Storsaeter J.: Declining pertussis incidence in Sweden following the introduction of acellular pertussis vaccine. *Vaccine*, **21**, 2015–2021 (2003)
73. Onorato I., Wassilak S., Meade B.: Efficacy of whole-cell pertussis vaccine in preschool children in the United States. *JAMA*, **267**, 2745–2749 (1992)
74. Packard E., Parton R., Coote J., Fry N.: Sequence variation and conservation in virulence-related genes of *Bordetella pertussis* isolates from the UK. *J. Med. Microbiol.* **53**, 355–365 (2004)
75. Plotkin S., Orenstein W., Offit P., Edwards K.: Plotkin's Vaccines 7th Edition. Elsevier, 2017
76. Polak M., Zasada A., Mosiej E., Krysztopa-Grzybowska K., Witkowski L., Rzczkowska M., Piekarska K., Lutyńska A.: Pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in Poland – a country with whole-cell pertussis primary vaccination. *Microbes Infect.* **21**, 170–175 (2018)
77. Polewicz M., Gracia A., Buchanan R., Strom S., Halperin S., Potter A., Babiuk L., Gerds V.: Influence of maternal antibodies on active pertussis toxoid immunization of neonatal mice and piglets. *Vaccine*, **29**, 7718–7726 (2011)
78. Ramsay M., Farrington C., Miller E.: Age-specific efficacy of pertussis vaccine during epidemic and non-epidemic periods. *Epidemiol. Infect.* **111**, 41–48 (1993)
79. Roberts R., Moreno G., Bottero D., Gaillard M., Fingerhann M., Graieb A., Rumbo M., Hozbor D.: Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine*, **26**, 4639–4646 (2008)

80. Romanus V., Jonsell R., Bergquist S.: Pertussis in Sweden after the cessation of general immunization in 1979. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, **6**, 364–371 (1987)
81. Rumbo M., Hozbor D.: Development of improved pertussis vaccine. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, 2450–2453 (2014)
82. Sato Y., Kimura M., Fukumi H.: Development of a pertussis component vaccine in Japan. *Lancet*, **1**, 122–126 (1984)
83. Sato Y., Sato H.: Development of acellular pertussis vaccines. *Biologicals*, **27**, 61–69 (1999)
84. Seubert A., D'Oro U., Scarselli M., Pizza M.: Genetically detoxified pertussis toxin (PT-9K/129G): implications for immunization and vaccines. *Expert Rev. Vaccines*, **13**, 1191–1204 (2014)
85. Shapiro-Shapin C.: Pearl Kendrick, Grace Eldering, and the pertussis vaccine. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1273–1278 (2010)
86. Sharma S., Benson H., Mukkur T., Rigby P., Chen Y.: Preliminary studies on the development of IgA-loaded chitosan-dextran sulphate nanoparticles as a potential nasal delivery system for protein antigens. *J. Microencapsul.* **30**, 283–294 (2013)
87. Shuel M., Jamieson F., Tang P., Brown S., Farrell D., Martin I., Stoltz J., Tsang R.: Genetic analysis of *Bordetella pertussis* in Ontario, Canada reveals one predominant clone. *Int. J. Infect. Dis.* **17**, e413–417 (2013)
88. Skerry C., Mahon B.: A live, attenuated *Bordetella pertussis* vaccine provides long-term protection against virulent challenge in a murine model. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 187–193 (2011)
89. National Library of Medicine: First adult safety trial on nasal live attenuated *B. pertussis* vaccine 31.01.2012 <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01188512?cond=pertussis&draw=2&rank=7> (29.11.2019)
90. Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny: Szczepienia-info, <https://szczepienia.pzh.gov.pl/> (29.11.2019)
91. Thorstensson R., Loch C. i wsp.: A phase I clinical study of a live attenuated *Bordetella pertussis* vaccine – BPZE1; a single centre, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of BPZE1 given intranasally to healthy adult male volunteers. *PLoS One*, **9**, e83449 (2014)
92. Trollfors B. i Rabo E.: Whooping cough in adults. *Brit. Med. J.* **283**, 696–697 (1981)
93. van Gent M., Pierard D., Lauwers S., van der Heide H.G., King A.J., Mooi F.R.: Characterization of *Bordetella pertussis* clinical isolates that do not express the tracheal colonization factor. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **51**, 149–154 (2007)
94. Weber C., Boursaux-Eude C., Coralie G., Caro V., Guiso N.: Polymorphism of *Bordetella pertussis* isolates circulating for the last 10 years in France, where a single effective whole-cell vaccine has been used for more than 30 years. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 4396–4403 (2001)
95. White J., Fairley C., Owen D., Matthews R., Miller E.: The effect of an accelerated immunisation schedule on pertussis in England and Wales. *Commun. Dis. Rep. CDR Rev.* **6**, 86–91 (1996)
96. Williams M., Sen K., Weigand M., Skoff T., Cunningham V., Halse T., Tondella M.: CDC Pertussis Working Group. *Bordetella pertussis* strain lacking pertactin and pertussis toxin. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 319–322 (2016)
97. Winter K., Zipprich J., Harriman K., Murray E., Gornbein J., Hammer S., Yeganeh N., Adachi K., Cherry J.: Risk factors associated with infant deaths from pertussis: a case-control study. *Clin. Infect. Dis.* **61**, 1099–1106 (2015)
98. World Health Organization: Report of the meeting on case definition of pertussis, 10–11.01.1991, https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66921/MIM_EPI_PERT_91.1.pdf?sequence=1&isAllowed=y (29.11.2019)
99. World Health Organization: Pertussis vaccines: WHO position paper. Weekly Epidemiological Record, 09.2015, <https://www.who.int/wer/2015/wer9035.pdf?ua=1> (29.11.2019)
100. Zackrisson G., Taranger J., Trollfors B.: History of whooping cough in nonvaccinated Swedish children, related to serum antibodies to pertussis toxin and filamentous hemagglutinin. *J. Pediatr.* **116**, 190–194 (1990)